

Université Chouaib Doukkali
Faculté des Sciences
Département de Biologie

11/12

TD2 Biologie Moléculaire - SVI4

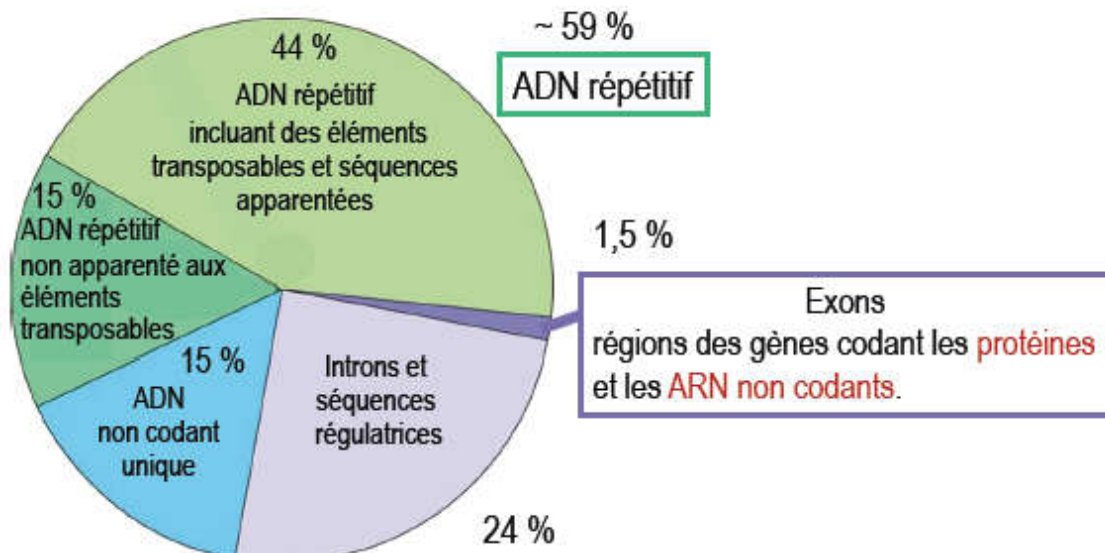
Ex-1 : Répondre par vrai ou faux en justifiant la réponse

a. Le matériel génétique d'une cellule de mammifère est porté par plusieurs chromosomes, formés chacun par une molécule d'ADN contenant de nombreux gènes. Tout l'ADN chromosomique est transcrit ;

Faux.

Oui Le matériel génétique d'une cellule de mammifère est porté par plusieurs chromosomes, formés chacun par une molécule d'ADN contenant de nombreux gènes ; mais

l'ADN chromosomique n'est pas entièrement transcrit en ARNm car il existe des séquences promotrices et des séquences régulatrices non transcrites mais nécessaires pour moduler l'activité des gènes. De plus, il existe des séquences d'ADN appelées « ADN non codant » dont le rôle n'est pas clairement défini et qui représente la majorité de l'ADN.



b. Chaque brin d'un duplex parental sert de matrice pour la synthèse d'un brin fils pour s'apparier avec lui et former un nouvel ADN double brin. Le brin parental orienté 5' 3' sert de matrice pour le brin précoce ;

Faux



Oui. Le brin d'ADN qui sert de matrice à la réplication est le brin parental. Le nouveau brin complémentaire au brin parental est le brin fils. À l'issue de la réplication, chacune des deux molécules d'ADN nouvellement formée est constituée d'un brin parental et d'un brin fils néoformé. Mais

le brin précoce est le brin complémentaire du brin parental orienté 3' vers 5'. Le brin précoce est donc orienté 5' vers 3' (Il est donc créé de façon continue, dans le sens 5' vers 3')

c. L'ADN-pol III est incapable de commencer la synthèse du brin précoce elle a besoin d'une amorce, mais peut faire la synthèse directement du brin retardé sans avoir besoin du primosome

Faux

L'ADN polymérase III ne peut pas initier la synthèse de l'ADN. Elle ne peut fonctionner que si elle se fixe d'abord sur une amorce. Cette amorce est formée d'un court segment d'ARN complémentaire à un segment du brin à copier. Il est synthétisé par le primosome (assemblage de deux enzymes, la topoisomérase et la primase). Celui-ci procède dans le sens 5' → 3' sur le brin d'ADN matrice et amorce de ce fait l'initiation de la réplication.

Le brin précoce est synthétisé de façon continue à partir d'une amorce unique d'ARN.

le brin tardive est synthétisé de façon discontinu à partir de multiples amorces d'ARN. Ces amorces sont synthétisées par le primosome.

d. L'information génétique est portée par de longs polymères d'ADN. Elle est codée sous forme de séquences linéaires formées à partir des nucléotides A, T, G, C et U ;

FAUX

L'information génétique est portée par de longs polymères de nucléotides. Elle est codée sous forme de séquences linéaires formées à partir de 4 nucléotides A, T, G, C ;

e. L'ADN-pol III réplique l'ADN avec une fidélité remarquable, mais quand une erreur est introduite elle est incapable de la rectifier ;

Faux

L'ADN-pol III a la capacité de corriger les erreurs d'incorporation dans le brin néoformé (auto-correction). Lorsque l'ADN polymérase fait une erreur et qu'un mésappariement est formé, celle-ci va revenir en arrière et hydrolyse le nucléotide incorrect, c'est l'activité exonucléase 3'-5'. Elle peut alors réinsérer la base correcte, et reprendre la réplication. Ce processus de relecture par l'ADN polymérase améliore la fidélité du processus réplcatif et fait baisser le taux d'erreur.

f. La primase est une ARN-pol qui synthétise les amorces des fragments d'Okasaki. Ces amorces sont retirées par l'hélicase puis remplacées par des morceaux équivalents d'ADN par l'ADN-pol I.

FAUX

OUI La primase est une ARN-pol qui synthétise les amorces des fragments d'Okasaki ; mais

Ces amorces sont retirées par la ribonucléase RNaseH puis remplacées par des morceaux équivalents d'ADN par l'ADN-pol I. chez les procaryotes on n'a pas de RNase H (elle existe chez les eucaryotes). Chez les procaryotes c'est l'ADN-pol I qui hydrolyse les amorces pour les remplacer et pas l'hélicase

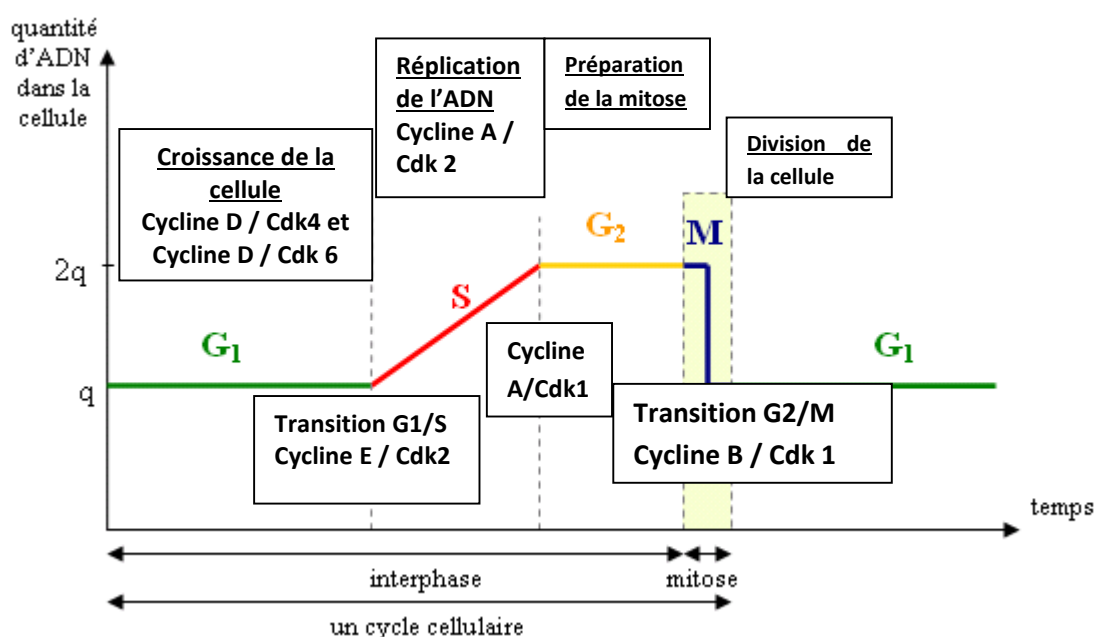
L'hélicase quant à elle crée la fourche de réplication en brisant les liaisons hydrogènes entre les deux brins de la double hélice d'ADN ce qui permet leur séparation.

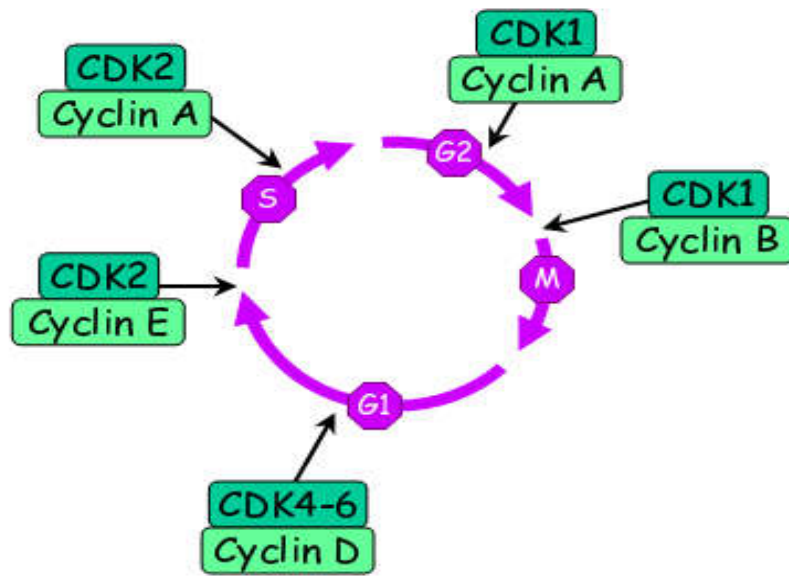
g. La fourche de réplication est asymétrique car elle contient deux ADN-pol structuellement distinctes ?

Faux. Elle est asymétrique car elle comporte un brin précoce et un brin retardé

Ex-2 : Montrez à l'aide de schémas les différentes étapes de synthèse du tétra-désoxyribonucléotide (CGAT).

Ex-3 : Montrez à l'aide d'un graphe la variation de la quantité d'ADN au cours du cycle cellulaire en précisant (dans le graphe) les caractéristiques de chaque étape et le complexe Cdk-Cycline impliqué.





G1 :

la cellule croît en taille, et fabrique les protéines cytoplasmiques qui seront ensuite divisées pour les cellules filles.

phase S de synthèse : La cellule réplique son ADN. La quantité d'ADN est doublée,

G2 : phase de contrôle de la bonne transcription du matériel génétique, impliquant des gènes et des protéines importants pour le bon déroulement de la mitose.

La phase M ou mitotique, c'est la phase de division cellulaire proprement dite. La phase M comprend 4 étapes :

1. La prophase : les chromosomes deviennent visibles car ils sont condensés. Il y a aussi la mise

en place du fuseau de division ainsi que la rupture de l'enveloppe nucléaire.

2. La métaphase: Les chromosomes migrent et s'alignent sur le fuseau mitotique.

3. L'anaphase: Les deux chromatides de chaque chromosome se séparent, et migrent chacune vers un pôle de la cellule.

4. La télophase: La chromatine se décondense, et l'enveloppe nucléaire se reforme. A la fin de cette phase à lieu la cytotélerèse, c'est à dire la division de la cellule en deux cellules filles.

Une fois la phase mitotique achevée la cellule peut:

- repasser en phase G1 et recommencer le cycle de réplication**
- entrer en phase G0 et resté a l'état de repos jusqu'à sa réactivation.**

Ex-4 : A quoi correspond la séquence ARS chez la levure ?

ARS (pour séquence à réplication autonome) est une séquence qui permet à une molécule d'ADN de se répliquer chez la levure. Elle correspond à une origine de réplication de l'ADN de levure.

- **Le génome de la levure contient plusieurs origines de réplication (environ 400 sur les 17 chromosomes de *S. cerevisiae*) comme toutes les cellules eucaryotes.**
- **Ces régions quand elles sont introduites dans un plasmide, elles le rendent capable de se répliquer de façon autonome.**
- **Elles sont dénommées alors séquences à réplication autonome « ARS ».**
- **L'analyse de ARS1 (ARS de 180 pb) a montré que l'origine de réplication comporte un segment A (15 pb) qui s'est avéré essentiel à la réplication, plus 3 séquences B1, B2 et B3 qui permettent une réplication plus efficace.**
- **La comparaison de nombreuses ARS a permis de déterminer une séquence consensus de 11 pb qui favorise la fixation d'un complexe protéique à ARS (ORC : Origin Recognition Complex) et l'enclenchement de la réplication.**

A/T TTTATA/GTTTA/T

T/AAAATAT/CAAAT/A

Ex-5 : Dans une cellule, le gène qui code une des protéines impliquées dans la réplication a été inactivé par une mutation. En l'absence de cette protéine la cellule essaye de se répliquer une dernière fois. Quel serait le résultat si la mutation affectait l'une des protéines suivantes : ADN-pol II ; ADN-pol III ; ADN-ligase ; Clamp coulissant de l'ADN-pol ; ADN-hélicase ; ADN-primase ; protéine Ssb.

Pol II : impliquée dans la réplication de l'ADN endommagé et possède activité exonucléase 5'→3' . Son inactivation n'aura aucun effet sur la réplication de l'ADN

ADN-pol III : pas de réplication de l'ADN on aura seulement des amorces

ADN-ligase : la réplication s'arrête pendant l'élongation car les fragments d'okazaki ne seront pas liés

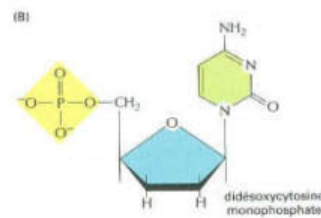
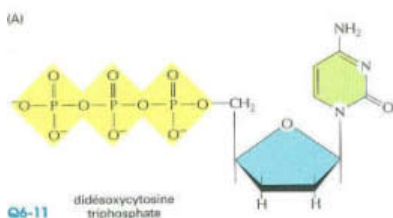
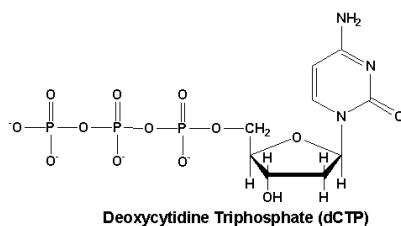
Clamp coulissant de l'ADN-pol : l'ADN polymérase se détache rapidement de l'ADN après avoir polymérisé seulement quelques nucléotides. Les polymérases sont retenues à l'ADN parental grâce à cette protéine. La réplication peut avoir lieu mais de manière très inefficace

ADN-hélicase : pas d'initiation de la réplication (pas de formation de fourche de réplication) càd les deux brins de la double hélice d'ADN ne vont pas s'ouvrir et se dérouler

ADN-primase : pas de synthèse des amorces d'ARN donc pas d'élongation

SSB (single strand binding) des bactéries : reformation de la double hélice après l'action de l'hélicase donc la réplication ne va pas avoir lieu

Ex-6 : Si au cours de la réplication, on fournit à la cellule le didésoxycytosine triphosphate en excès au par rapport à dCTP. Quel serait la conséquence sur la réplication ? et si on l'ajoutait à une concentration de 10% de celle du dCTP ? Quel effet obtiendrait-on si on ajoutait le didésoxycytosine monophosphate.



L'ADN polymérase utilise les désoxyribonucléotides triP pendant la réplication de l'ADN. Elle ajoute un nucléotide, fourni par un nt-triP à une extrémité 3' -

OH de l'ADN. Il lui faut donc toujours une extrémité 3' –OH libre.

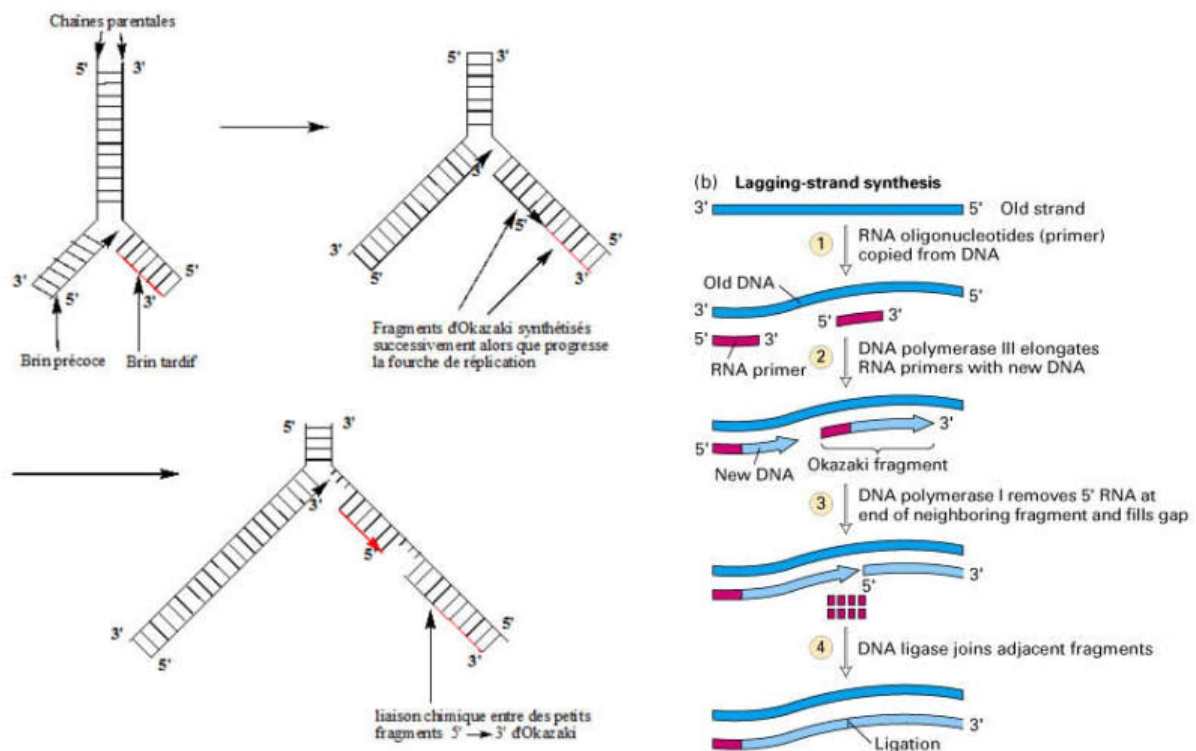
Le didésoxycytosine triphosphate (ddCTP) est identique à dCTP sauf qu'il a le groupe hydroxyle (-OH) en C3' du sucre en moins. Il est reconnu par l'ADN polymérase et il est intégré dans l'ADN comme le dCTP. Or, la polymérase n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête. Ainsi, s'il est fourni en excès par rapport à dCTP, les brins vont être synthétisés jusqu'à ce que le premier G est rencontrée dans le brin matrice. ddCTP va être ensuite incorporé à la place de dCTP, et l'élongation de ce brin va être arrêtée

Si on ajoutait la ddCTP à une conc de 10% de celle du dCTP : ddCTP a 1 chance sur 10 d'être incorporé dans le brin en synthèse à chaque fois qu'un G est rencontré sur le brin matrice. Ainsi, une population de fragments d'ADN sera synthétisé de taille différente. Ces résultats forment la base des méthodes utilisées pour déterminer la séquence de nucléotides dans un fragment d'ADN (Séquençage).

Quel effet obtiendrait-on si on ajoutait le didésoxycytosine monophosphate : le ddCMP n'a pas le groupe triphosphate en 5' ni le groupe hydroxyle en 3' de sucre. L'absence de triP se traduit par le fait que le ddCMP ne peut pas fournir l'énergie nécessaire pour la réaction de polymérisation des nt dans l'ADN.

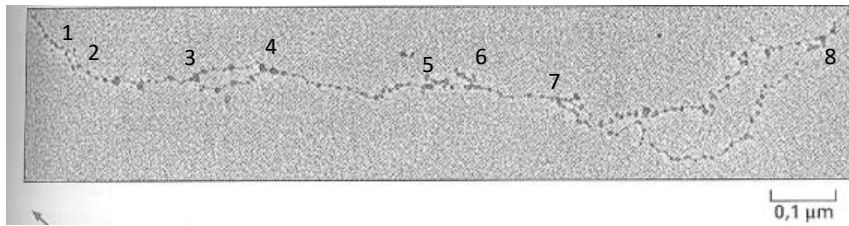
ddCMP n'est un substrat de l'ADN polymérase et ne peut pas être incorporé dans le brin en synthèse. Donc le ddCMP, a n'importe quelle concentration, n'aura aucun effet sur la réplication de l'ADN.

Ex-7 : Montrez par un schéma la synthèse d'un brin tardif chez les procaryotes



Ex-8 : En utilisant l'échelle indiquée, estimez la longueur de l'ADN entre deux fourches de réplication. En numérotant les fourches de gauche à droite et dans l'ordre, combien de temps se passera-t-il avant que les fourche 4 et 5, et 6 et 7 se rencontrent ? Sachant que les fourches de réplication se déplacent à la vitesse de 100 nucléotides par seconde chez les eucaryotes. Combien (en pourcentage) représente ce chromosome

de la totalité du génome de la mouche qui compte $1,8 \times 10^8$ paires de nucléotides.



Longueur d'ADN entre les fourches 2 et 3 : ~ 2 cm qui correspond selon l'échelle (1cm---0,1µm) à $0,2 \mu\text{m}$

Longueur d'ADN entre les fourches 4 et 5 : 2,5 cm qui correspond selon l'échelle à $0,25 \mu\text{m}$
Longueur d'ADN entre les fourches 6 et 7 : 1,5 cm qui correspond selon l'échelle à $0,15 \mu\text{m}$

Temps entre les fourches 4 et 5 : $0,25 \mu\text{m} / 0,34 \text{ nm} = 735 \text{ pb}$ donc $0,25 \mu\text{m}$ correspond à 735 pb
 $735 / 100 = 7,35 \text{ sec}$

Temps entre les fourches 6 et 7 : $0,15 \mu\text{m} / 0,34 \text{ nm} = 441 \text{ pb} / 100 = 4,41 \text{ sec}$

Attention il y'a erreur de calcul : $14 \text{ cm} \times 0.1 \mu\text{m} = 1.4 \mu\text{m}$ ce qui donne un % à la fin de 0.0023%

Ex-9 : Une cellule de mammifère a généralement 1,2 mètre d'ADN double brin (quand elle est complètement tendue). Le temps total pour dupliquer l'ADN est 5 heures. Combien d'origines de réplication y a-t-il, si le taux de duplication est $16 \mu\text{m} / \text{min}$?

Si il n'y avait qu'une seule origine de réplication, le taux de duplication de l'ADN serait donné par :

Taux = Longueur de l'ADN / temps de duplication

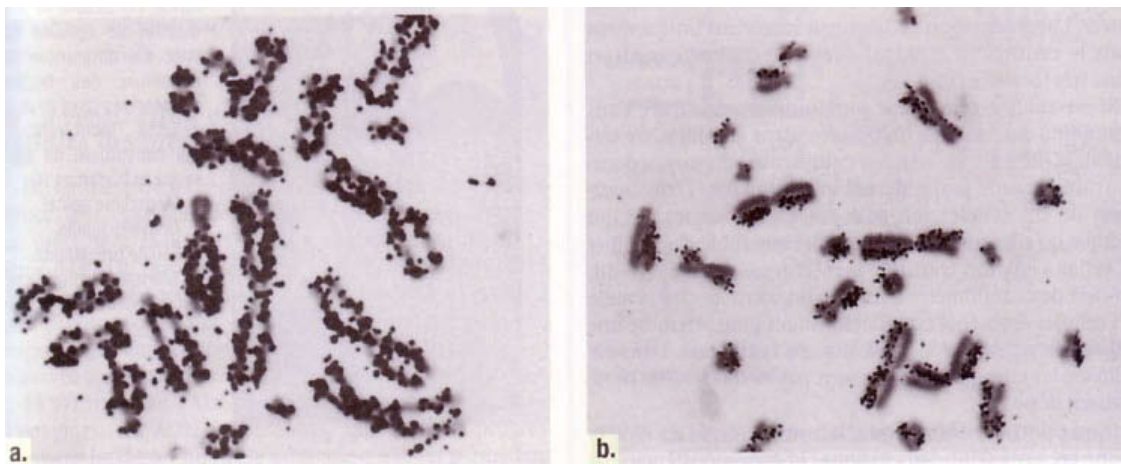
=> Taux = $1,2 / (5 \times 60) = 4000\mu\text{m}/\text{min}$

Manifestement, il existe plus d'une origine de réplication

Soit n le nombre d'origines de réplication. Le taux de duplication de chaque origine est $16\mu\text{m}/\text{min}$.

Ainsi, $n = 4000 / 16 = 250$

Ex-10 : Autoradiographies de chromosomes au cours de la mitose.



De jeunes racines en croissance ont été cultivées sur un milieu contenant de la thymine radioactive pendant plusieurs cycles cellulaires. Certaines de ces racines sont alors traitées par la colchicine qui bloque les mitoses en métaphase. La radioactivité des chromosomes des cellules en mitose est révélée par autoradiographie **(a)**. Après lavage, on transfère des racines non traitées à la colchicine sur un milieu froid.

On révèle la radioactivité des chromosomes au cours de la mitose suivante **(b)**.

1. A quoi sert la thymine radioactive ?

la thymine radioactive pénètre dans les racines dont les cellules se divisent activement et, comme elle est un précurseur de la synthèse d'ADN, elle sera incorporée spécifiquement dans l'ADN des chromosomes mais pas dans l'ARN. Et donc la thymine radioactive permet de marquer l'ADN nouvellement synthétisé

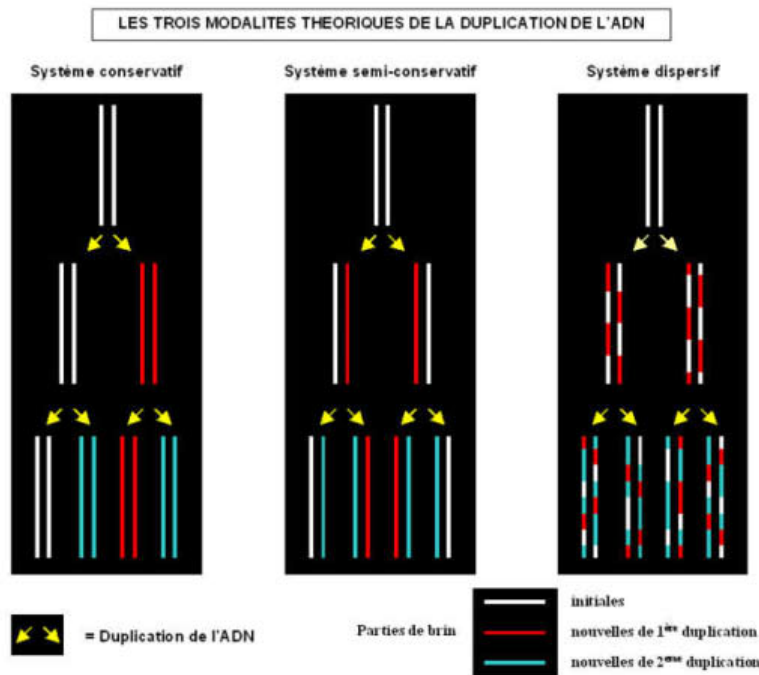
2. A quel stade du cycle cellulaire les chromosomes ont-ils fixés la molécule radioactive ?

Phase S « synthèse » du cycle cellulaire

3. Expliquez ce qui s'est passé entre les phases correspondant aux photos a et b.

En (a) les deux chromatides de chaque chromosome sont marqués ; En (b) chaque chromosome a une chromatide marquée et une chromatide non marquée.

A la fin de la première duplication des molécules d'ADN ont toutes un brin radioactif et un brin non radioactif, mais comme chacun d'eux s'associe à un brin nouveau non radioactif lors de la seconde duplication, cela donnera une moitié des molécules d'ADN radioactives et une moitié des molécules non radioactives.



4. Quel type de réplication s'agit-il ?

Réplication semi-conservative : la molécule mère donne un de ses brins à chaque molécule fille, qui est complétée par une chaîne nouvellement synthétisée.

Ex-11 : Les enzymes de réparation de l'ADN réparent préférentiellement les bases mésappariées sur les nouveaux brins en utilisant l'ancien brin comme matrice. Si ces réparations étaient faites sans vérifier sur quel brin, celui-ci réduirait-il les erreurs de réplication ? Expliquez.

Non. Celui-ci ne va pas réduire les erreurs de réplication au contraire ça ne peut qu'engendrer des mutations dans l'ADN parental.

La reconnaissance du brin matrice par rapport au brin nouvellement synthétisé est basée sur la présence de méthylations spécifiques dans le premier (le brin néosynthétisé n'est pas encore méthylé), ce qui permet à la cellule de reconnaître la copie de l'original et d'éviter de modifier ce dernier. Ce système de réparation des mésappariements (mismatch repair) permet de détecter les erreurs de réplication et donc d'éviter la transmission d'une information erronée, c'est-à-dire une mutation aux générations ultérieures.

Si c'était la matrice ADN qui était réparée au lieu des brins (précoce et retardé) des mutations permanentes apparaîtraient dans le génome. Les informations initiales seraient détruites et remplacées par de nouvelles. Si au cours de la réplication les systèmes de réparation de l'ADN ne pouvaient faire la distinction entre les brins on aurait 50% de chances qu'une erreur de réplication soit corrigée.